

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



# State Intellectual Property Office of the People's Republic

Title: Cationic polypeptide process for expressing antimicrobe in plant			
Application Number:	98112269	Application Date:	1998.09.28
Publication Number:	1249310	Publication Date:	2000.04.05
Approval Pub. Date:		Granted Pub. Date:	
International Classification:	C07K 14/415 C07K 14/435 C07K 14/46 C07K 7/08		
Applicant(s) Name:	Zhou Guoqing		
Address:	(643100)		
Inventor(s) Name:	Zhou Guoqing		
Attorney & Agent:			
<b>Abstract</b>			
<p>A transgenic plant expression vector containing three antimicrobe cationic polypeptides is constructed. The plant tissue is introduced to these genes via agrobacillus and in the callus culture, the callus resisting phytopathogen (bacteria and fungus) can be externally chosen. Choosing these calli can regenerate plants and directly test its antifungal and antibacterial powder. After these transgenic plants are ripened, whole or partial plant can be harvested.</p>			

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

## [12]发明专利申请公开说明书

C07K 14/415

C07K 14/435 C07K 14/46

C07K 7/08 C.2N 15/63

[21] 申请号 98112269.8

[43]公开日 2000年4月5日

[11]公开号 CN 1249310A

[22]申请日 1998.9.28 [21]申请号 98112269.8

[71]申请人 周国庆

地址 643100 四川省荣县四川裕丰机械厂

[72]发明人 周国庆

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 一种在植物中表达抗微生物的阳离子多肽技术

[57]摘要

构建转基因的植物表达载体,含有三种抗微生物的阳离子多肽。植物组织通过农杆菌导入这些基因,并在愈伤组织期可以作体外选择抗植物病原菌(细菌和真菌)的愈伤组织;选择这些愈伤组织可以再生植株,并直接体内检测其抗真菌和细菌的能力;这些抗病转基因系生长成熟,收获整株植物或部分植物如块茎、块根等。

ISSN 1008-4274

专利文献出版社出版

# 权利要求书

1. 本发明是一种转基因植物的技术，权利要求三种抗微生物的阳离子多肽 (CEMA, Demaseptin B 和 Temporin A) 及 CEMA 的前体 pro-CEMA 在植物中表达的载体构造，及其起动机。

2. 如权利要求 1 所述的三种阳离子多肽和 CEMA 的前体形式，其多肽顺序为：

a. CEMA 顺序为：

KWKLFKKIGIGAVLKVLTTGLPALKLTG

b. Pro-CEMA 其 Pro 顺序为：

EPLQARAEEVAAPEQIAADPEVVVSLAWDESLAPKHPGSRKN

c. Demaseptin B:

AMWKDVLKKIGTVALHAGKAALGAVADTISQ

d. Temporin A:

FLPLIGRVLSGIL

3. 基因表达的载体为 pBI121 及 pBI221，其起动机有整株植物中表达或组织特异性表达的起动机。

a. 整株植物表达的起动机有：

(a) CaMA 35S promoter

(b) 2X CaMV 35S + AMV RNA4 translation enhance element

(c) 超级起动机 (Super promoter)

(d) 逆转性的超级起动机

b. 组织特异性表达的起动机有：

(a) 种子特异表达的起动机

(b) 根特异性表达的起动机

(c) 受伤应急反应的起动机

4. 愈伤组织的抗植物病原性体外选择：即愈伤组织可在体外接种病原性细菌或真菌，选择其抗病性愈伤组织。

5. 上述三种基因在土豆、烟草、西红柿、油菜、水稻、棉花、甘兰、萝卜、小麦、大豆及其它各种植物中的表达。

6. 转基因的植物对植物病原性细菌和真菌具良好的抗性。

7. 利用上述转基因植物作为工厂生产新一代抗菌素。

99.04.01  
说明书

## 一种在植物中表达抗微生物的阳离子多肽技术

本发明属生物技术领域。具体地讲，本发明涉及抗微生物阳离子多肽(cationic peptide)及其表达载体和启动子，在植物中的转染和表达，转基因植物的选择和再生，转基因植物对其细菌与真菌性病原菌的抗性。

经济植物病原细菌和真菌导致数千万元的损失。在发展中国家约有 40% 的作物减产直接与植物病原细菌和真菌有关。植物基因工程技术使外原抗病基因能整合进植物基因组中。转基因的技术已在某些抗虫和抗病植物中取得了成功。但是在已有的转基因植物中，其抗病性是有限的，缺乏广谱性。表达抗微生物的阳离子多肽可以引入广谱抗病性基因进植物中，增加植物对细菌的抗性。

阳离子多肽来自于昆虫、脊椎和无脊椎动物及植物中。根据其结构，分为  $\alpha$ -螺旋， $\beta$ -折叠及同时具  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠等几大类。这些多肽具有广谱的微生物活性，可以抗格兰氏阳性和阴性细菌、寄生虫，甚至病毒。通过计算机模拟进行结构修饰及不同阳离子多肽的杂交，可以创造比天然更有活力的阳离子多肽。表达这些多肽在植物不仅可以提高植物的抗性，同时尝试用植物作为工厂，生产新一代抗微生物的阳离子多肽类抗生素。

本发明目的是：

- (1) 在植物中表达几种特殊的阳离子多肽，增强植物对细菌性和真菌性病害的抗性；
- (2) 利用植物作为工厂，生产新一代抗生素；
- (3) 转基因的中草药植物中表达抗菌肽，以提高中草药产量，改进和提高中草药的药性。

### 发明的实施方案：

本发明提供了抗微生物的多肽基因及其在特别的表达载体上的克隆位置。一般来讲，这些载体包含阳离子多肽的基因或以它们的前体形式插入到各种启动子控制的植物表达载体上。将这些载体上的目的基因通过农杆菌或基因枪转入植物中，转基因的植物首先在愈伤组织阶段，通过体外抗病选择，然后再生成植株，再直接体内检测整株植物对植物病原性细菌或真菌的抗性。最后，植物生长成熟，收获整株植物或部份植物如块茎、块根等。

### 抗微生物多肽基因的选择

我们选择了 3 种抗微生物的阳离子多肽及一种阳离子多肽的前体形式，如下表所示：

#### a. CEMA 顺序为：

KWKLPKKIGIGAVLKVLTTGLPALKLTK

#### b. Pro-CEMA 其 Pro 顺序为：

EPLQARAEVAAPEQLAADIPVVVSLAWDESLAPKHGSRKN

#### c. Dermaseptin B:

AMWKDVLKKIGTVALHAGKAALGAVADTISQ

99.04.01  
说明书

d. Temporin A:  
FLPLIGRVLSGIL

### 植物表达载体的构建

如下列描述所示, 含抗微生物的基因的植物表达载体的构建:

#### (1) pSAI4:

去掉 pBI121 上的 CaMV 35S 启动子和  $\beta$ -glucuronidase, 插入 HindIII-EcoRI DNA 片段。该片段含 2 $\times$ 35S 启动子, 一个 AMV RNA4 翻译增强子, CEMA 基因和 NOS-ter 顺序, 插入并克隆于 pBI121 中。

#### (2) pRSPC4, pSSPC4, pPINC4:

0.65 kb 启动子片段从 pSAI4 中去除, 插入 HindIII-XbaI 片段。这些 HindIII-XbaI 片段是分别来自于 pRSP221(根特异性表达的启动子), pSSP221(种子特异性表达启动子) 和 pRT210(伤愈应急反应的启动子)。

#### (3) pDPC121 和 pDPC221:

前者含 pro-CEMA 基因顺序, 在 pBI121 载体上, 具 2 $\times$ 35S 启动子, 用于致癌农杆菌为中介转染的表达。后者含 pro-CEMA DNA 顺序在 pBI121 载体上, 用于基因枪直接转入植物细胞中。

#### (4) pDSB1217 和 pDSB2212, pTA1217, pTA2217:

用 XbaI 和 SstI 分别从 pBI121 和 pBI221 上去掉 1.8Kb 的 Gus 基因, 插入 Dermaseptin B (DSB) gene 顺序 (pDSB1217, pDSB2212) 或 Temporin A 基因顺序 (pTA1217, pTA2217)。

#### (5) pDDSB1212:

Dermaseptin B 基因构造在 pBI121 载体上, 含有 2 $\times$ 35S 启动子和 AMV RNA4 增强子。

#### (6) pPDSB1217, pSDSB1212, pRTA1217:

用 XbaI 和 SstI 分别消化 pRSP121 或 pSSP221, 插入从 pDSB1217(DSB gene 约 120bp) 或 pTA1217(Temporin A gene, 约 60bp) 来的 XbaI-SstI 片段。

#### (7) pRDSB1217:

去掉在 pRDSB1217 上约 0.6kb HindIII-XbaI 启动子片段, 插入从 pRT210 上来的约 1kb 的 HindIII-XbaI 片段, 含应急反应的启动子顺序(Wound-inducible promoter)。

#### (8) pDTA1217, pSTA1217 和 pPTA1217:

去掉 pTA1217 载体上 0.8kb 的 CaMV35S promoter。如插入从 pBI525 来的 2 $\times$ CaMV35S Promoter, 一个 AMV RNA4 增强子构成 pDTA1217; 如插入从 pSSP121 来的 1.16kb 的种子特异性表达的启动子顺序构成 pSTA1217。如插入从 pRT210 来的受伤应急反应的启动子构成 pPTA1217。

#### (9) pSUPC4:

pBI121 上去掉 CaMV 35S 启动子和  $\beta$ -glucuronidase, 构造超级启动子在 CEMA 之前。

99.04.01  
说明书

(10) pSUPD1217:

pBI121 上去掉 CaMV 35S 启动子和  $\beta$ -glucuronidase, 构造超级启动子在 Dermaseptin B 之前。

(11) pSUPT:

pBI121 上去掉 CaMV 35S 启动子和  $\beta$ -glucuronidase, 构造超级启动子在 Temporin A 之前。

(12) pRSUPC4:

pBI121 上去掉 CaMV 35S 启动子和  $\beta$ -glucuronidase, 构造逆转性超级启动子在 CEMA 之前。

(13) pRSUPD1217:

pBI121 上去掉 CaMV 35S 启动子和  $\beta$ -glucuronidase, 构造逆转性超级启动子在 Dermaseptin B 之前。

(14) pRSUPT:

pBI121 上去掉 CaMV 35S 启动子和  $\beta$ -glucuronidase, 构造逆转性超级启动子在 Temporin A 之前。

(15) pHSUP1: pBI121 上去掉 CaMV 35S 启动子和  $\beta$ -glucuronidase, 构造超级启动子在有 6 个 Histidine-tagged 的 Dermaseptin B 之前。

(16) pHRSUP1:

pBI121 上去掉 CaMV 35S 启动子和  $\beta$ -glucuronidase, 构造超级启动子在有 6 个 Histidine-tagged 的 Dermaseptin B 之前。

(17) pTerm3:

pBI121 上去掉 CaMV 35S 启动子和  $\beta$ -glucuronidase, 构造双倍的—CaMV 35S+AMV RNA4—CEMA, 双倍的 CaMV 35S+AMV RNA4—Dermaseptin B, 双倍的 CaMV 35S+AMV RNA4—temporin A 在此载体上。

所有上述基因载体都通过限制性核酸内切酶消化、PCR 放大和 DNA 序列分析证实。

农杆菌转染植物组织

利用农杆菌转染植物按 Block M.D. (1998, Theor Appl Genet 76:767-774) 描述的方法进行。

早期体外选择抗植物病原菌的植株

在愈伤组织阶段, 在培养愈伤组织的培养基中直接加入植物病原菌, 选择能抗这些病原菌的愈伤组织再把它们诱导成植株。

抗微生物多肽基因整合进植物中

利用 PCR 或 R<sub>1</sub>-PCR 方法, 可检测抗微生物的基因是否整合于植物中, 并且在植物中

99.04.01  
说明书

表达。

**转基因植物的再生**

转基因植物的诱导再生方法如 Block M.D. (1998, Theor Appl Genet 76:767-774) 描述所示。

**实施例**

质粒载体 pSAI4 构建如图所示。

来自于 pR78h proCEMA 载体的 CEMA 基因被克隆在 pBIS24 上，然后最终克隆在 pBI121 上，命名于 pSAI4 (图 1A)。

5'-末端 primer 顺序为：

CAA GGA AAA ACG GTC TAG AGC ATA TGA AAT GGA AAC, 含 XbaI 位点。

3'-末端 primer 顺序为：

GAA CTC GAG CAG CGA GCT CTT ACT TAG TTA GCT TC, 含 BamHI 位点。

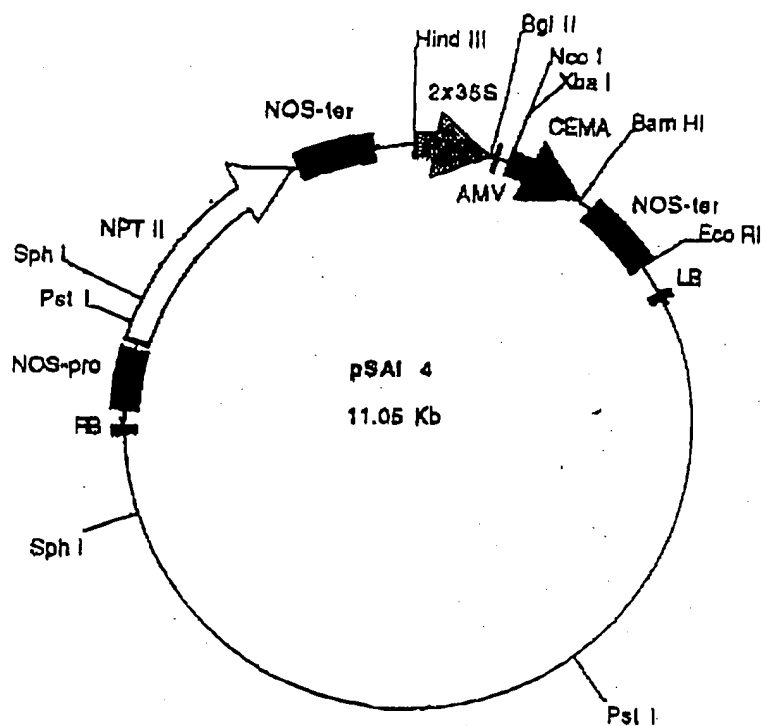
图 1B 显示 CecropinA, melittin 和 CEMA 的顺序，阳离子氨基酸是粗体字母，阴离子氨基酸在字母下面划线。



98.10.13

## 说明书附图

A



B

Cecropin A: KWKLFFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK  
 Melittin: GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ  
 CEMA: KWKLFFKKIGIGAVLKVLTTGLPALKLTK

图 1